

中華民國經濟部智慧財產局

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE
MINISTRY OF ECONOMIC AFFAIRS
REPUBLIC OF CHINA

茲證明所附文件，係本局存檔中原申請案的副本，正確無訛，
其申請資料如下：

This is to certify that annexed is a true copy from the records of this office of the application as originally filed which is identified hereunder:

申請日：西元 2003 年 11 月 21 日
Application Date

申請案號：092132715
Application No.

申請人：財團法人工業技術研究院
Applicant(s)

局長

Director General

蔡綠生

發文日期：西元 2004 年 1 月 8 日
Issue Date

發文字號：09320028930
Serial No.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：

※申請日期：

※IPC 分類：

壹、發明名稱： (中文/英文)

基因重組蛋白純化、修飾及固定之方法/Method for recombinant protein purification, modification and immobilization

貳、申請人： (共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

財團法人工業技術研究院/Industrial Technology Research Institute

代表人：(中文/英文) 翁政義/WENG, CHENG I

住居所或營業所地址：(中文/英文)

新竹縣竹東鎮中興路四段 195 號/ No.195, Sec.4, Chung Hsin Rd.,
Chu Tung Town, Hsin Chu Hsien, Taiwan, R.O.C.

國籍：(中文/英文) 中華民國/R.O.C.

參、發明人： (共 2 人)

1. 郭泰志/KUO, TAI CHIH

2. 林瀚榮/LIN, HAN JUNG

住居所地址：(中文/英文)

1. 台北市大安區新生南路 1 段 157 巷 36 號 2F/
2F., No.36, Lane 157, Sec. 1, Sinsheng S. Rd., Da-an District, Taipei
City 106, Taiwan (R.O.C.)

2. 桃園縣桃園市國際路 1 段 1202 巷 18-2 號/
No.18-2, Lane 1202, Sec. 1, Guoji Rd., Taoyuan City, Taoyuan
County 330, Taiwan (R.O.C.)

國籍：(中文/英文)

1. 2. 中華民國/R.O.C.

肆、聲明事項：

本案係符合專利法第二十條第一項第一款但書或第二款但書規定之期間，其日期為： 年 月 日。

◎本案申請前已向下列國家（地區）申請專利 主張國際優先權：

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

3.

4.

5.

主張國內優先權(專利法第二十五條之一)：

【格式請依：申請日；申請案號數 順序註記】

1.

2.

主張專利法第二十六條微生物：

國內微生物 【格式請依：寄存機構；日期；號碼 順序註記】

國外微生物 【格式請依：寄存國名；機構；日期；號碼 順序註記】

熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

伍、中文發明摘要：

本發明係關於基因重組蛋白之純化、修飾及固定之方法，其步驟係包含以基因工程技術令目標蛋白質具有一段特殊標誌並表現該基因重組蛋白，以親和力層析法純化及修飾基因重組蛋白，以離耦合劑將基因重組蛋白由親和力管柱中置換出來，及固定基因重組蛋白於特定基材上。該方法係結合純化、修飾及固定等步驟，增加基因重組蛋白的利用性。由於省略透析或分子篩純化步驟，不僅縮短了移除未反應試劑之時間，並使基因重組蛋白之回收率提高。

陸、英文發明摘要：

The present invention relates to a method for purifying, modifying and immobilizing recombinant protein. The method comprises the steps of tagging the target protein and expressing the recombinant protein by use of the genetic engineering; purifying and modifying recombinant protein by use of the decoupling reagents; and immobilizing the recombinant protein onto a modified substrate. The method, combining steps of purification, modification and immobilization, enhances the use of recombinant protein in the application. The omission of the step of dialysis or molecular sieve purification leads to a shorter period dedicating for removing excessive reagents and the increase of efficiency of recombinant protein recovery.

柒、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(一)圖。

(二)本代表圖之元件代表符號簡單說明：

無

捌、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

玖、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於基因重組蛋白之純化、修飾及固定之方法，其係結合純化、修飾及固定等步驟，以省略透析或分子篩純化步驟，縮短移除未反應試劑之時間，並使基因重組蛋白之回收率提高及將基因重組蛋白固定於基材上。

【先前技術】

隨著人類基因圖譜的建立，將有越來越多的蛋白質由其中被解密出來，為有效達到鑑定與分析蛋白質的功能，各種純化、修飾及固定化蛋白質的技術正蓬勃地發展。

為達到純化的目的，常見的方法係使用各類型之層析技術，層析法係利用蛋白質個體間的差異（例如：等電點、分子量等）來達到篩選特定蛋白質的目的，但利用等電點或分子量進行分離之層析技術其特異性不高，分離效果不佳，且伴隨分離步驟常發生樣品稀釋與流失的狀況。為改善此一缺失，利用基因工程技術使標的物蛋白質帶有一段特殊序列，使該蛋白質能專一性地附著在能捉住該特殊序列的管柱上而與其他雜質分開，再利用離耦合劑將純化之蛋白質置換出來，此方法已經被逐漸地使用於基因重組蛋白的純化上。常見加諸於蛋白質之上的特殊序列如組織胺酸標誌 (Histidine tag)，其係搭配能專一性地捕捉 Histidine tag 的親和力管柱（例如：Ni-IDA 管柱）將非專一性的其他雜質分開，再使用對應 Histidine tag 的離耦合劑（例如：imidazole）將蛋白質從管柱內置換出來。此方法較傳統方法具有較佳的專一性，可有效降低傳統層析技術分離效果不佳的缺點。

經純化之蛋白質，為增加其使用與回收之效率，常見之

方法係將蛋白質固定於基材之上，使蛋白質在進行分析前後之數量不會隨步驟之進行流失。傳統之固定化係於基材表面進行衍生化，使基材帶有特定之化學官能基，再以這些化學官能基與蛋白質胺基酸序列支鏈上之官能基形成化學鍵結來達到固定化之目的，但此方法常造成蛋白質活性的喪失，且固定化形成之化學鍵結多為不可逆之反應。

利用生物分子間專一而緊密結合的特性取代化學鍵結做為固定化的方法，已經成為一股趨勢，以生物素 (biotin) 及抗生物素 (streptavidin) 為例，由於 biotin 可加在各種生物分子上 (例如：DNA、蛋白質)，再配合鍍有 streptavidin 的基材，即可將生物分子固定在基材之上，以便各式的運用。

但不論是利用離耦合劑將蛋白質由管柱中取代出來的純化步驟，或者將蛋白質進行如生物素化 (biotinylation) 的修飾反應，都需要透過透析法或者分子篩去除離耦合劑或未反應完的修飾試劑，然而這些都不是理想的方法。透析法主要有三個缺點，(1)不方便：透析時需要準備大量的透析液，因此若欲同時對眾多樣品進行透析將是一件非常不方便的事。(2)耗時：每次透析時間至少要 4-6 小時才能達到平衡，並至少進行二至三次，故完成時間約需至少一天。(3)蛋白質回收率低：在透析過程中，蛋白質可能會變性或吸附在透析膜上。分子篩也有二個主要缺點，(1)管柱容量小：每次只能將小於十分之一管柱體積的樣品加到分子篩管柱內。(2)回收率低及稀釋的問題：由於鹽類濃度在分子篩管柱沖提過程中改變，蛋白質會發生並吸附在管柱上，並被沖提液稀釋。因此，如何提升純化與修飾步驟的蛋白質回收率，便成為重要的課題。

在美國專利第 6,150,123 號中揭露了管柱中生物素化的方法 (in column biotinylation)，其係利用親和力管柱先捕捉基因重組蛋白，再於管柱中進行生物素化。實際上，只要基因重組蛋白被親和力管柱捕捉的反應與生物素化的反應不互相衝突，生物素化的進行並不需侷限於親和力管柱之中，其係可逕行於水溶液中反應，再利用親和力管柱進行基因重組蛋白的捕捉。

至於利用親和力管柱進行基因重組蛋白的捕捉，在美國專利第 6,150,123 號提出利用特定配體與受體的結合特性 (ligand-receptor)，例如：目標蛋白質與其單株抗體、醣蛋白與外源凝集素 (lectin) 以及酵素與受體；其係將配體固定在管柱之中，透過配體與受體間的親和力捕捉相對應的受體。此方法雖然具有專一性，但於純化目標蛋白質前，必須先獲得每種蛋白質的抗體或天然配體，若需同時純化兩種或兩種以上的蛋白質，就必須純化每個目標蛋白質個別的抗體或配體，這些目標蛋白質抗體或天然配體的純化將造成操作上的複雜，使時間與成本的支出增加，顯然不是一個方便而普遍性的作法。

【發明內容】

有鑑於習知技術的缺失，本發明係提供一種基因重組蛋白純化、修飾及固定的方法，係利用基因工程方法將特殊標誌序列加入目標蛋白質基因並表現該基因重組蛋白，之後以親和力層析法純化及修飾基因重組蛋白，再使用離耦合劑將基因重組蛋白置換出來，最後固定基因重組蛋白於特定基材上。

本發明之目的係提供一種基因重組蛋白之純化、修飾及

固定之方法，包含以下步驟：以基因工程技術令目標蛋白質具有一段特殊標誌並表現該基因重組蛋白；以親和力層析法純化及修飾前述基因重組蛋白；以離耦合劑將被親和力吸附之基因重組蛋白質置換出來；及固定前述基因重組蛋白於基材上。

前述特殊標誌序列係包含組織胺酸標誌（Histidine tag）、麥芽糖鍵結標籤（Maltose-binding tag）或谷胱甘鈦-S-轉移酶融合蛋白標籤（Glutathione-S-Transferase fusion protein，GST tag）。

前述表現基因重組蛋白係利用大腸桿菌、酵母菌、哺乳類細胞或體外轉錄/轉譯系統（*in vitro* transcription / translation）進行表現量產。

前述親和力層析法係依據特殊標誌序列選擇相對應之親和力管柱進行基因重組蛋白之捕捉。

當前述特殊標誌序列为 Histidine tag 時所使用之親和力管柱為金屬鉗合管柱（例如 Ni-IDA 管柱）；當前述特殊標誌序列为麥芽糖鍵結標誌（Maltose-binding tag）時所使用之親和力管柱為澱粉水解酵素（amylose）管柱；當前述特殊標誌序列为 GST tag 時所使用之親和力管柱為谷胱甘鈦（glutathione）管柱。

前述基因重組蛋白的修飾係利用生物素化（biotinylation）反應使基因重組蛋白帶有生物素（biotin）官能基。

前述生物素化反應（biotinylation）係可於利用親和力層析管柱純化基因重組蛋白前進行，或者於親和力管柱捕捉具特殊標誌序列之基因重組蛋白後於管柱中進行。

前述經修飾及純化之基因重組蛋白係利用離耦合劑自親和力管柱中清洗置換出來；前述之"離耦合劑"係指可將基因重組蛋白由親和力管柱清洗置換出來之化合物或蛋白質；前述之離耦合劑係根據特殊標誌序列與親和力管柱之組合有不同的選擇；例如當前述特殊標誌序列为 Histidine tag 時，離耦合劑可使用咪唑（imidazole）；當前述特殊標誌序列为 Maltose-binding tag 時，離耦合劑可使用麥芽糖（maltose）；當前述特殊標誌序列为 GST tag 時，離耦合劑可使用谷胱甘鈦（glutathione）。

前述基因重組蛋白的固定化係於基材表面塗覆可與前述基因重組蛋白修飾之官能基產生親和力鍵結的物質，藉此將已修飾之基因重組蛋白固定於基材表面。當基因重組蛋白經生物素化反應（biotinylation）帶有 biotin 官能基時，基材表面塗覆之物質係為抗生物素（streptavidin）。前述基材係包含金屬（例如：鐵珠）或高分子聚合物。

前述固定於基材之基因重組蛋白可經由過濾或清洗移除溶液中之離耦合劑。

本發明提供之基因重組蛋白純化、修飾及固定之方法，包含以基因工程技術令欲表現之蛋白質具有一段特殊標誌，使其得以留在能專一辨認該特殊標誌之親和力管柱中，而基因重組蛋白之修飾反應（如：biotinylation）可於溶液中進行，再通入親和力管柱中捕捉，或者於親和力管柱捕捉基因重組蛋白後再於管柱中進行。之後利用離耦合劑將基因重組蛋白由管柱中置換出來後，最後利用固定化的程序可直接去除溶液中之離耦合劑。透過本發明之方法可改進薄膜透析或分子篩過濾耗時及低回收率的缺點，且不侷限於單一基

因重組蛋白的應用，而是可將多種基因重組蛋白同時量產與純化，由於不同的基因重組蛋白皆帶有相同之特殊標誌，故僅需於單一步驟中透過單一親和力管柱進行多種基因重組蛋白的辨識捕捉，有效改善習知技術中(如美國專利第6,150,123)單一配體僅與單一受體結合的限制，可同時進行多種蛋白質之純化。

【實施方式】

為迅速將基因重組蛋白修飾並固定於基材表面上，本發明係提供一種基因重組蛋白之純化、修飾及固定之方法，如第一圖所示，該方法包含以下步驟：以基因工程技術令目標蛋白質具有一段特殊標誌並表現該基因重組蛋白；以親和力層析法純化及修飾基因重組蛋白；以離耦合劑將被親和力吸附之基因重組蛋白質置換出來；及固定前述基因重組蛋白於基材上。各步驟詳細敘述如下：首先在一可誘發基因表現載體內將一段特殊標誌序列加在目標蛋白質基因的5'端，常見的特殊標誌序列有組織胺酸標誌(Histidine tag)、麥芽糖鍵結標誌(Maltose-binding tag)及GST tag等，接著將載體置入表現系統中大量生產基因重組蛋白。經表現之未經純化、帶有特殊標誌之基因重組蛋白可透過兩種模式達到修飾及純化，一是先於溶液進行修飾反應，再將溶液通入親和力管柱中，藉由親和力管柱對特殊標誌的專一性使基因重組蛋白被滯留於管柱中。另一是先將基因重組蛋白通入親和力管柱中，因基因重組蛋白帶有特殊標誌會被親和力管柱專一性地辨識捕捉，再將滯留於管柱中之基因重組蛋白進行修飾。

親和力管柱的選用係依據基因重組蛋白所擁有的特殊標誌決定：當特殊標誌為組織胺酸標誌(Histidine tag)，

則親和力管柱選用金屬鉗合管柱（例如：Ni-IDA 管柱）；當特殊標誌為麥芽糖鍵結標誌（maltose-binding tag），則親和力管柱選用澱粉水解酵素（amylose）管柱；當特殊標誌為 GST tag 時，則親和力管柱選用谷胱甘鈦(glutathione)管柱。

前述之修飾係將基因重組蛋白加上一分子，該分子係可與另一分子產生專一性的親和力，常見的例子係為生物素 (biotin) 與抗生物素 (streptavidin)，biotin 可加在各種生物分子（例如 DNA，蛋白質等）上，藉著 biotin 與 streptavidin 專一而緊密結合的特性，逐漸地被應用於分子生物技術。

經修飾並被親和力管柱捕捉的基因重組蛋白，先以緩衝溶液沖洗管柱以除去多餘的修飾試劑後，再透過離耦合劑的使用將基因重組蛋白由親和力管柱中置換出來，離耦合劑係根據特殊標誌及親和力管柱的組合來選則：當特殊標誌-親和力管柱為 Histidine tag 搭配金屬耦合管柱時，離耦合劑為咪唑 (imidazole)；當特殊標誌-親和力管柱為 maltose-binding tag 搭配 amylose 時，離耦合劑為麥芽糖 (maltose)；當特殊標誌-親和力管柱為 GST tag 搭配 glutathione 管柱時，離耦合劑為 glutathione。

利用離耦合劑將基因重組蛋白由親和力管柱中置換出來後，溶液中含有的離耦合劑可透過基因重組蛋白的固定化後的清洗步驟移除，前述基因重組蛋白的固定化係依據蛋白質修飾之分子，於基材表面塗覆與前述修飾之分子產生親和力鍵結的物質，例如當基因重組蛋白修飾之分子為生物素 (biotin) 時，基材表面則塗覆抗生物素 (streptavidin)。

以下實施例係用於進一步了解本發明之優點，並非用於限制本發明之申請專利範圍。

實施例 1.利用大腸桿菌表現之基因重組人類第 21 型膠原蛋白質之 Thrombospondin N-terminal like domain 的純化、生物素化與固定化

實施例 1 係根據第二圖所示之方法流程進行本發明之蛋白質純化、修飾及固定之方法。首先利用帶重組基因載體 pET28A (Novagen) 之大腸桿菌 *E. coli* BL21De3 為表現寄主，在含誘發劑 IPTG (1mM) 的 LB 培養液中表現經設計含有 Histidine tag 之基因重組人類第 21 型膠原蛋白質之 Thrombospondin N-terminal like domain (TSPN like domain)。由第三圖 Lane 1 (有 IPTG 誘導) 與 Lane 2 (無 IPTG 誘導) 的比較中可以發現，在 IPTG 誘導下產生箭頭所指處之基因重組 TSPN like domain，Lane 5 (Lane 3 與 Lane 4 為分子量標記) 為初步純化之基因重組 TSPN like domain，其分子量為 TSPN like domain 加上 Histidine tag，符合預測之 25 kD，將含有基因重組 TSPN like domain 之溶液通過一 Ni-IDA 親和力管柱層析，此時含有 Histidine tag 之基因重組 TSPN like domain 會選擇性地留在管柱上，通過管柱之溶液 (Lane 6) 中幾乎不含基因重組 TSPN like domain，接著加入生物素化試劑 (biotinylation reagent, NHS-LC-biotin) 進行修飾，使附著於管柱內的基因重組 TSPN like domain 帶有生物素，此反應並不會影響基因重組 TSPN like domain 對親和力管柱之專一性附著，所以通過管柱之試劑中並不含基因重組 TSPN like domain (Lane 7)，反應之後以緩衝液沖洗管柱，除去未反應之生物素化

試劑，通過管柱之緩衝液亦不含基因重組 TSPN like domain (Lane 8)，接著利用離耦合劑 (imidazole) 將基因重組 TSPN like domain 由親和力管柱中置換出來，由於基因重組 TSPN like domain 已經帶有生物素，所以分子量較未反應前大 (Lane 9)，將含有利用 biotin 修飾之基因重組 TSPN like domain 與利用 streptavidin 修飾之鐵珠混合進行固定化，待 biotin 與 streptavidin 緊密結合後，以磁鐵將鐵珠與溶液分離，此時溶液中已經不含基因重組 TSPN like domain (Lane 10)。

實施例 2. 利用大腸桿菌表現之基因重組人類第 21 型膠原蛋白質之 Thrombospondin N-terminal like domain 的純化、生物素化與固定化

如第四圖所示，其操作流程與實施例 1 之第二圖所示之流程大致相同，但基因重組 TSPN like domain 的生物素化反應則提前於溶液中進行。本實施例之結果如第五圖所示，其中 Lane 1 為分子量標記，經初步純化之基因重組 TSPN like domain (Lane 2) 可先在溶液中予以生物素化，反應後之 TSPN like domain 由於多帶了生物素分子，因此分子量稍微變大 (Lane 3)，將生物素化後的基因重組 TSPN like domain 通入 Ni-IDA 管柱時，仍可藉由 Histidine tag 而被選擇性地留在管柱中，此時通過管柱之溶液只有很低濃度的基因重組 TSPN like domain 殘留 (Lane 4)，接著以緩衝液沖洗管柱除去多餘的生物素化試劑，通過管柱之緩衝液中亦不含基因重組 TSPN like domain (Lane 5)；接著利用離耦合劑 (Immidazole) 將基因重組 TSPN like domain 由親

和力管柱中置換出來（Lane 6），被置換出來的基因重組 TSPN like domain 溶液中加入利用 streptavidin 修飾之鐵珠混合，待 biotin 與 streptavidin 緊密結合後完成固定化後，以磁鐵將鐵珠與溶液分離，此時溶液中已經不含基因重組蛋白 TSPN like domain (Lane 7)。

雖然本發明已以較佳實施例揭露如上，然其並非用以限定本發明，任何熟悉此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此，本發明之保護範圍，當視後附之申請專利範圍所界定者為準。)

【圖式簡單說明】

第一圖係為本發明之基因重組蛋白純化、修飾及固定之方法流程圖。

第二圖係為本發明實施例 1 之基因重組蛋白純化、修飾及固定之方法流程圖。

第三圖係為本發明實施例 1 之基因重組蛋白純化、修飾及固定各操作步驟之電泳分析圖。

第四圖係為本發明實施例 2 之基因重組蛋白純化、修飾及固定之另一方法流程圖。

第五圖係為本發明實施例 2 之基因重組蛋白純化、修飾及固定各操作步驟之電泳分析圖。

拾、申請專利範圍：

1. 一種基因重組蛋白純化、修飾及固定之方法，係包含下列步驟：

以基因工程技術令目標蛋白質具有一段特殊標誌基因並表現該基因重組蛋白；

利用親和力層析法純化及修飾基因重組蛋白；

以離耦合劑將被親和力吸附之基因重組蛋白置換出來；及

固定該基因重組蛋白於基材上。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之基因重組蛋白純化、修飾及固定之方法，其中特殊標誌係包含組織胺酸標誌 (Histidine tag) 、麥芽糖鍵結標籤 (Maltose-binding tag) 或谷胱甘鈦-S-轉移酶融合蛋白標籤 (GST tag) 。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述之基因重組蛋白純化、修飾及固定化之方法，其中特殊標誌係為組織胺酸標誌 (Histidine tag) 。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之基因重組蛋白純化、修飾及固定之方法，其中基因重組蛋白係利用大腸桿菌、酵母菌、哺乳類細胞或體外轉錄/轉譯系統 (in vitro transcription/translation) 進行生產。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之基因重組蛋白純化、修飾及固定之方法，其中親和力層析法係依據特殊標誌選擇相對應之親和力管柱進行基因重組蛋白之捕捉。
6. 如申請專利範圍第 5 項所述之基因重組蛋白純化、修飾及固定之方法，其中特殊標誌為組織胺酸標誌 (Histidine tag) 時，親和力管柱係為金屬鉗合管柱。

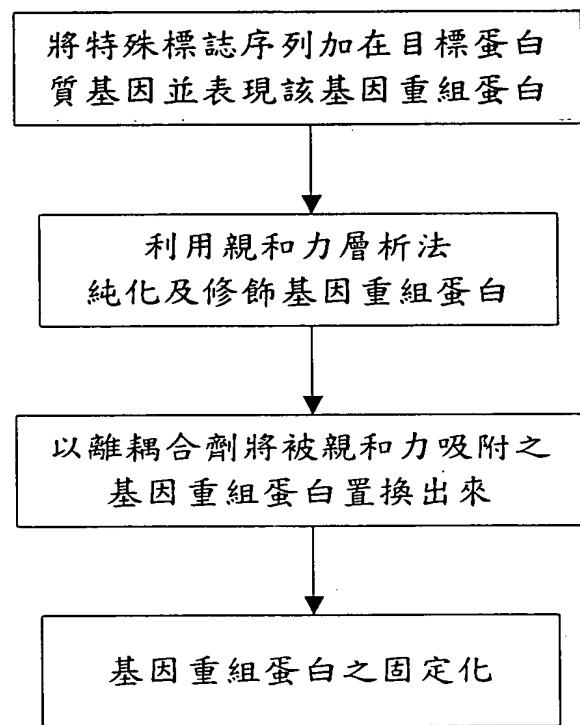
7. 如申請專利範圍第 6 項所述之基因重組蛋白純化、修飾及固定之方法，其中金屬鉗合管柱係為 Ni-IDA 管柱或 Cu-IDA 管柱。
8. 如申請專利範圍第 5 項所述之基因重組蛋白純化、修飾及固定化之方法，其中特殊標誌為麥芽糖鍵結標誌 (maltose-binding tag) 時，親和力管柱係為澱粉水解酵素 (amylose) 管柱。
9. 如申請專利範圍第 5 項所述之基因重組蛋白純化、修飾及固定之方法，其中特殊標誌為谷胱甘鈦-S-轉移酶融合蛋白標籤 (GST tag) 時，親和力管柱係為谷胱甘鈦 (glutathione) 管柱。
10. 如申請專利範圍第 1 項所述之基因重組蛋白純化、修飾及固定之方法，其中基因重組蛋白的修飾係利用生物素化 (biotinylation) 反應使基因重組蛋白帶有生物素 (biotin) 官能基。
11. 如申請專利範圍第 10 項所述之基因重組蛋白純化、修飾及固定之方法，其中基因重組蛋白的修飾係可於親和力管柱純化基因重組蛋白前於溶液中進行。
12. 如申請專利範圍第 10 項所述之基因重組蛋白純化、修飾及固定之方法，其中基因重組蛋白的修飾係可於親和力管柱捕捉具特殊標誌之基因重組蛋白後於管柱中進行。
13. 如申請專利範圍第 11 項所述之基因重組蛋白純化、修飾及固定之方法，其中基因重組蛋白係利用離耦合劑自親和力管柱中置換，前述之離耦合劑係根據特殊標誌與親和力管柱之組合選擇。

14.如申請專利範圍第 13 項所述之基因重組蛋白純化、修飾及固定之方法，其中特殊標誌與親和力管柱為組織胺酸標誌 (Histidine tag) 搭配金屬耦合管柱時，離耦合劑係為咪唑 (imidazole)。

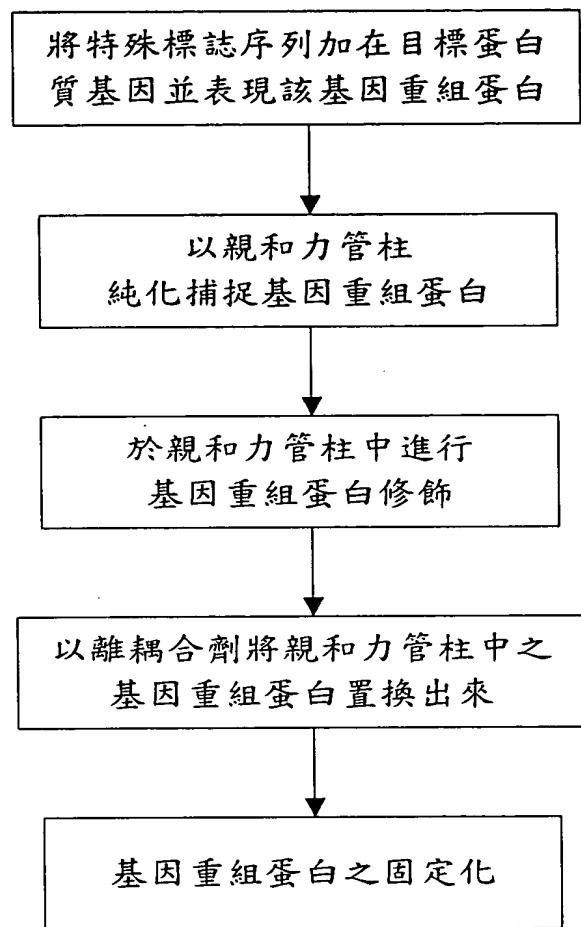
15.如申請專利範圍第 13 項所述之基因重組蛋白純化、修飾及固定之方法，其中特殊標誌與親和力管柱為麥芽糖鍵結標誌 (maltose-binding tag) 搭配澱粉水解酵素 (amylose) 管柱時，離耦合劑係為麥芽糖 (maltose)。

16.如申請專利範圍第 13 項所述之基因重組蛋白純化、修飾及固定之方法，其中特殊標誌與親和力管柱為谷胱甘鈦-S-轉移酶融合蛋白標籤 (GST tag) 搭配谷胱甘鈦 (glutathione) 管柱時，離耦合劑係為谷胱甘鈦 (glutathione)。

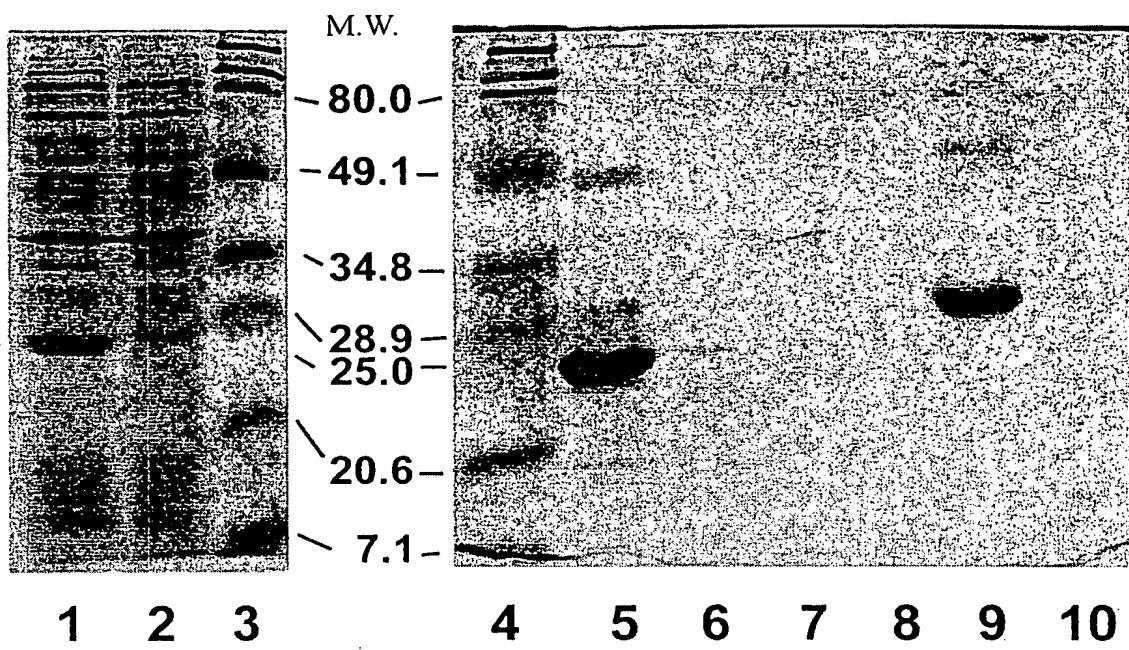
17.如申請專利範圍第 1 項所述之基因重組蛋白純化、修飾及固定之方法所述，其中基因重組蛋白的固定係將利用生物素 (biotin) 修飾之基因重組蛋白固定於表面塗覆抗生物素 (streptavidin) 之基材上。



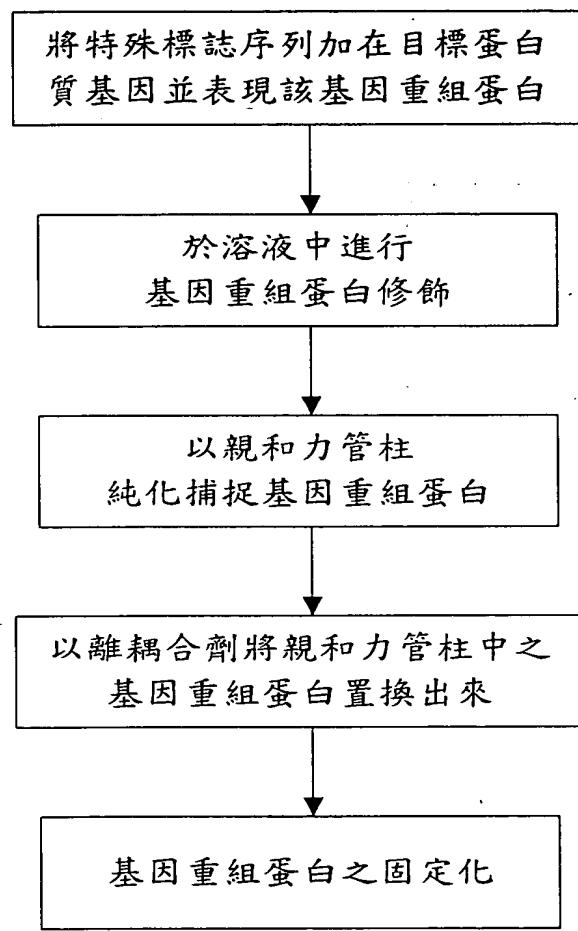
第一圖



第二圖

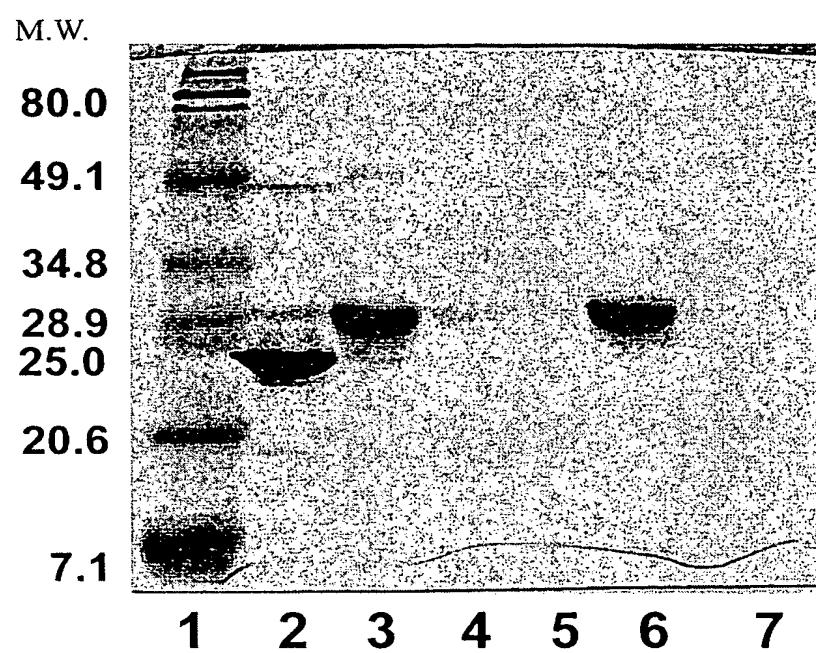


第三圖



第四圖

BEST AVAILABLE COPY



第五圖